

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-277

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ДОСТАВКИ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ТЯЖЕЛОЦЕПОЧЕЧНОГО АНТИТЕЛА В СОСТАВЕ RAAV**COMPARATIVE ANALYSIS OF GENETIC CONSTRUCTIONS FOR DELIVERY AND EXPRESSION OF THE HEAVY CHAIN ANTIBODY GENE IN RAAV**

Е. И. Рябова, А. А. Деркаев, М. А. Довгий, Р. М. Хоссаин, Д. В. Щебляков, И. Б. Есмагамбетов

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

E. I. Ryabova, A. A. Derkaev, M. A. Dovgiy, R. M. Hossain, D. V. Shcheblyakov, I. B. Esmagambetov

N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ ryabovaei96@gmail.com

Аннотация

Применение рекомбинантных rAAV-векторов для доставки и длительной экспрессии генов нейтрализующих антител является перспективным направлением в разработке альтернативных стратегий профилактики инфекционных заболеваний. В ходе данного исследования были сравнены три конструкции rAAV, содержащие ген антитела B11-Fc, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А. Продemonстрировано, что препарат rAAV-CMV-B11-Fc, содержащий промотор CMV, обеспечивает оптимальный уровень продукции антитела и защиту от ботулизма *in vivo*.

Abstract

The use of recombinant rAAV vectors for delivery and long-term expression of neutralizing antibody genes is a promising direction in the development of alternative strategies for the prevention of infectious diseases. In this study, three rAAV constructs containing the gene of the B11-Fc antibody, which neutralizes botulinum neurotoxin type A, were compared. It was demonstrated that the rAAV-CMV-B11-Fc preparation containing the CMV promoter provides an optimal level of antibody production and protection against botulism *in vivo*.

Введение

Пассивная генетическая иммунизация при помощи рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV) является перспективной, так как обеспечивает доставку и длительную экспрессию генов нейтрализующих антител. На сегодняшний день ведутся исследования по применению rAAV-векторов для профилактики инфекционных заболеваний, вызываемых ВИЧ, вирусом Эбола, вирусом гриппа А, SARS-CoV-2, а также интоксикаций, вызванных ботулиническим нейротоксином [1–5]. Этот подход позволяет преодолеть ограничения пассивной иммунизации, связанные с необходимостью многократного введения препаратов моноклональных антител, из-за ограниченного периода циркуляции в организме.

Одним из ключевых факторов, определяющих эффективность пассивной генетической иммунизации, является дизайн rAAV-вектора. На экспрессию антител *in vivo* влияет не только серотип вируса, но и промотор с регуляторными элементами, форма генома вектора (одноцепочечный или самокомплементарный). Таким образом, оптимизация генетической конструкции позволяет достичь оптимального уровня продукции антитела в организме.

В настоящей работе мы провели сравнительный анализ эффективности трех вариантов rAAV серотипа DJ для доставки и экспрессии гена модифицированного однодоменного антитела B11-Fc, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А (BoNT/A).

Результаты

В рамках работы были получены три варианта rAAV-векторов серотипа DJ, экспрессирующих однодоменное антитело B11-Fc, нейтрализующее ботулинический нейротоксин типа А (BoNT/A): rAAV-CMV-B11-Fc, rAAV-CASI-B11-Fc, и scAAV-CMV-B11-Fc. Получение rAAV осуществляли в клетках HEK293, а очистку проводили с использованием тангенциальной фильтрации и аффинной хроматографии.

rAAV-CMV-B11-Fc представляет собой одноцепочечный вектор (ssAAV), содержащий CMV-энхансер, промотор CMV и h β g интрон. Вектор rAAV-CASI-B11-Fc имеет аналогичную форму генома, но отличается использованием композитного синтетического промотора CASI. Данный промотор включает CMV-энхансер, CAG-промотор, UbC интрон, а также регуляторный элемент WPRE, способствующий стабилизации и увеличению экспрессии

мРНК. Вектор scAAV-CMV-B11-Fc основан на самокомплементарной форме генома (scAAV). Его экспрессионная кассета включает промотор CMV и SV40 small T интрон.

Уровень экспрессии B11-Fc *in vitro* оценивали в клеточных линиях НЕК293, CHO-S и C2C12 методом биослойной интерферометрии. Наибольшую продукцию антител в НЕК293 и CHO-S обеспечивал вектор rAAV-CMV-B11-Fc, тогда как конструкция с промотором CASI демонстрировала повышенную экспрессию в миобластах C2C12.

Протективную активность всех трех вариантов оценивали на модели интоксикации ботулотоксином типа А у мышей. Однократное внутримышечное введение вариантов rAAV в дозе 10^{11} гк/животное обеспечивало полную защиту от летальной дозы 10 LD_{50} BoNT/A спустя 2 суток после введения, а защитный эффект сохранялся как минимум до 78 суток после введения. Конструкция rAAV-CMV-B11-Fc обеспечивала частичную защиту на первые сутки после введения, в то время как scAAV-CMV-B11-Fc демонстрировала высокую эффективность в ранние сроки, что подтверждает потенциальное применение для экстренной профилактики. Наиболее высокий уровень защиты против BoNT/A *in vivo* продемонстрировали конструкции rAAV-CMV-B11-Fc и rAAV-CASI-B11-Fc, обеспечивающие защиту на 78-е сутки против 1000 и 800 LD_{50} соответственно.

Полученные данные демонстрируют, что дизайн rAAV-вектора — включая форму генома и тип промотора — оказывает ключевое влияние на уровень экспрессии трансгена, длительность защитного эффекта. Конструкции rAAV-CMV-B11-Fc и rAAV-CASI-B11-Fc перспективны для длительной пассивной иммунизации. Вектор scAAV-CMV-B11-Fc может применяться в условиях, требующих ранней экспрессии и защиты в режиме экстренной профилактики.

Литература

1. Derkaev A. A., Ryabova E. I., Esmagambetov I. B. et al. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type a prophylaxis // Front. Microbiol. 2022. Vol. 13. P. 960937.
2. Esmagambetov I. B., Ryabova E. I., Derkaev A. A. et al. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19 // Front. Immunol. — 2023. Vol. 14. P. 1129245.
3. Godakova S. A., Noskov A. N., Vinogradova I. D. et al. Camelid VHHs fused to human fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin a in mice // Toxins. 2019. Vol. 11, No. 8. P. 464.
4. Nieto K., Salvetti A. AAV vectors vaccines against infectious diseases // Front. Immunol. 2014. Vol. 5. P. 5.
5. Ryabova E. I., Derkaev A. A., Pimenov N. V. et al. The Use of Recombinant Adeno-Associated Virus for Passive Immunization and Protection against Infectious Diseases // Mol. Genetics, Microbiol. Virology. 2024. Vol. 39, No. 1. P. 31–39.